

Э.В. САНИН, вед. инж., НТК «Институт монокристаллов»

НАН Украины, Харьков,

А.И. НОВИКОВ, канд. хим. наук, доц., НТУ «ХПИ»,

А.Д. РОШАЛЬ, канд. хим. наук, ст. научн. сотр.,

ХНУ им. В.Н. Каразина, Харьков

ПРОИЗВОДНЫЕ 2-(3-КУМАРОИЛ)БЕНЗОПИРИЛИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ПРОТЕИНОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Исследованы спектральные свойства производных солей 2-(3-кумароил)бензопирилия (КБП) на предмет применения данных соединений в качестве флуоресцентных зондов для белков. Получены спектральные характеристики КБП в дихлорметановых, метанольных и водных растворах, а также в водных растворах сывороточного альбумина человека. Было показано, что из семи исследованных соединений перспективным флуорофором является диметоксипроизводное КБП. Данное соединение может быть использовано для детектирования наличия протеинов в различных средах с пределом обнаружения приблизительно 2×10^{-6} моль/л.

Ключевые слова: катионы бензопирилия, кумарины, дихромофронные системы, перенос заряда при возбуждении, флуоресцентные зонды

Введение. Одним из самых чувствительных, доступных и одновременно наименее трудоёмких методов обнаружения белков и полипептидов, а также анализа их конформации и структуры является флуоресцентная спектроскопия [1, 2]. Использование флуоресцентных методов предусматривает не только регистрацию и анализ положения полос испускания аминокислотных остатков в белковых молекулах, но также широкое применение специальных красителей-флуорофоров – зондов, изменяющих спектрально-флуоресцентные свойства при связывании с белковыми молекулами [1, 3, 4]. Использование флуоресцентных зондов для получения определенной структурной информации о белковых молекулах основано на чувствительности флуорофоров к определенным параметрам окружения [3, 4]. Так, оценка гидратированности белковых молекул осуществляется флуорофорами чувствительными к нуклеофильности и электрофильности среды; для детектирования конформационных изменений в белках необходимы флуорофоры, чувствительные к локальной полярности окружения и образованию водородных связей.

© Э.В.Санин, А.И. Новиков, А.Д. Рошаль, 2014

В зависимости от экспериментальных задач, к флуоресцентным зондам предъявляются разнообразные специальные требования – испускание в определенных диапазонах спектра, определенные значения квантового выхода флуоресценции, времен жизни молекул в возбужденном состоянии, изменения дипольного момента при возбуждении. Часто большое значение имеют заданный размер и конформация молекул флуорофоров, селективность или, наоборот, малая избирательность спектрального эффекта [3, 4]. Именно поэтому поиск новых флуоресцентных молекул является актуальной проблемой, привлекающей внимание специалистов из различных областей биологической и медицинской химии, биофизики, органического синтеза.

Экспериментальная часть. Данная статья посвящена исследованию взаимодействия с белковыми молекулами производных 2-(3-кумароил)бензопирилия (КБП) – нового класса органических солей, молекулы которых состоят из двух фрагментов – кумаринового и бензопирилиевого. Структуры изученных соединений приведены на рис. 1.

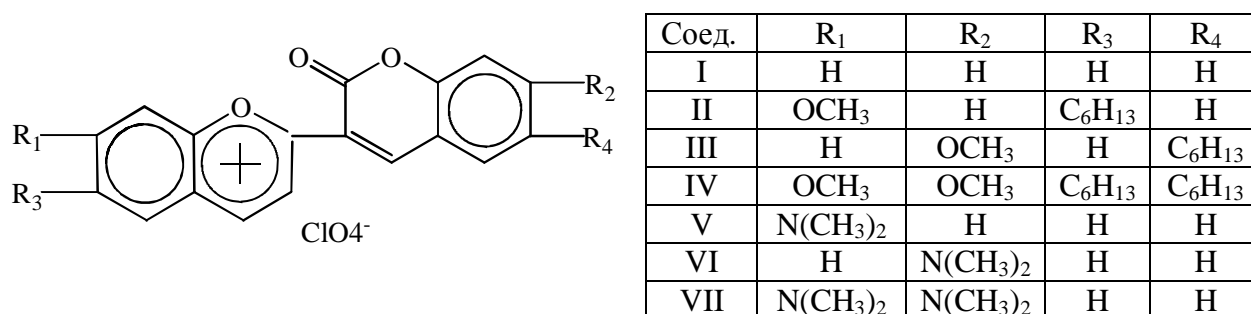


Рисунок 1 – Структуры перхлората 2-(3-кумароил)бензопирилия и его производных

Кумариновый фрагмент встречается во многих флуоресцентных красителях уже используемых в различных отраслях науки и техники [5], бензопирилиевый катион входит в состав природных пигментов – антоцианинов, обеспечивающих красно-фиолетовую гамму цветов и фруктов [6]. Сочетание кумаринового флуорофора и органического катиона, обладающего высокой чувствительностью к характеристикам окружения, а также протекание переноса заряда между этими фрагментами при возбуждении могут быть основой для разработки новых флуоресцентных зондов для исследования белков и протеин-содержащих объектов.

Спектральное поведение солей КБП предварительно изучали в неполярном и полярном неводных растворителях – дихлорметане и метаноле, затем эксперименты проводили в водных растворах в отсутствии и в присутствии белка – сывороточного альбумина человека (САЧ). Растворители были пред-

варительно обезвожены и очищены согласно [7]. Рабочие концентрации растворов перхлоратов КБП в воде и неводных растворителях находились в пределах $1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6}$ моль/л, концентрации САЧ в процессе титрования изменялись от нуля до $1,0 \times 10^{-5}$ моль/л. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Hitachi U3210 (Япония), спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония), обработку спектров проводили с помощью программного пакета Spectra DataLab [8]. В качестве флуоресцентного стандарта для определения квантовых выходов был использован краситель Су5 в метаноле.

Спектральные характеристики солей КБП в органических растворителях представлены в табл. 1.

Таблица 1. Спектральные характеристики перхлоратов КБП в органических растворителях.*

Параметры	Растворитель	I	II	III	IV	V	VI	VII
λ_{abs} , нм	дихлорметан	484	488	544	528	560	627	671
λ_{fl} , нм		542	541	600	607	678	690	694
$\Delta\nu_{\text{St}}$, см^{-1}		2210	2005	1715	2465	3110	1455	495
ϕ , %		17	12	36	12	0,8	12	57
λ_{abs} , нм	метанол	—	498	—	530	562	650	652
λ_{fl} , нм		—	557	—	658	677	692	693
$\Delta\nu_{\text{St}}$, см^{-1}		—	2125	—	930	4045	935	905
ϕ , %		—	4	—	3	—	5	23
$\Delta\nu_{\text{abs}}$, см^{-1}	—	—	410	—	70	60	565	—430
$\Delta\nu_{\text{fl}}$, см^{-1}		—	530	—	1275	-30	45	20
ω		—	3,0	—	4,0	—	2,4	2,5

* λ_{abs} – длина волны длинноволнового максимума поглощения; λ_{fl} – длина волны длинноволнового максимума испускания; $\Delta\nu_{\text{St}}$ – Стоксов сдвиг флуоресценции; ϕ – квантовый выход флуоресценции; $\Delta\nu_{\text{abs}}$ – сдвиг длинноволнового максимума поглощения при переходе от дихлорметана к метанолю; $\Delta\nu_{\text{fl}}$ – сдвиг длинноволнового максимума флуоресценции при переходе от дихлорметана к метанолю; $\omega = \phi_{\text{дихлорметан}} / \phi_{\text{метанол}}$ – отношение, показывающее во сколько раз уменьшается квантовый выход флуоресценции при переходе от дихлорметана к метанолю.

Анализ приведенных в таблице данных с точки зрения требований, предъявляемых к потенциальным флуоресцентным зондам, позволяет сделать следующие заключения.

Соединения **I** и **III** не могут быть использованы в качестве флуоресцентных зондов: первое – из-за низкой растворимости, второе – из-за отсут-

ствия флуоресценции в полярных растворителях. Аминопроизводные КБП **V** – **VII** излучают в красной области спектра, наиболее благоприятной для флуоресцентного анализа биологических образцов, однако полосы испускания практически нечувствительны к изменению свойств окружения. При переходе от неполярного дихлорметана к полярному и нуклеофильному метанолу, сдвиг полосы составляет от 20 до 45 см⁻¹, что не превышает величину ошибки спектрофлуориметра за счет люфта при повороте дифракционной решетки. Метоксипроизводные КБП **II** и **IV** флуоресцируют в желто-зеленой области спектра, причем переход от дихлорметана к метанолу приводит к довольно существенному батохромному сдвигу полос испускания.

Квантовые выходы почти всех КБП в неполярной среде находятся в интервале 12 – 57 %. Исключением является соединение **V**, имеющее низкий квантовый выход, поскольку природа его возбужденного состояния отлична от других КБП. Электронный переход $S_1 \rightarrow S_0$ у данного соединения локализован на бензопирилиевом фрагменте, в то время как для остальных КБП аналогичный электронный переход сопровождается переносом заряда между кумариновым и бензопирилиевым фрагментами.

С ростом полярности и нуклеофильности среды квантовые выходы резко снижаются. Гашение флуоресценции при переходе в более гидратированную и полярную среду, и, наоборот, ее возгорание при переходе в менее полярное окружение, может быть использовано для детектирования наличия пептидов в различных водных средах. Наиболее сильное изменение интенсивности флуоресценции (в 3 – 4 раза) также наблюдается у метоксизамещенных КБП **II** и **IV**.

Таким образом, анализ спектральных данных показал, что наиболее перспективными для использования в качестве флуоресцентных зондов являются соединения **II** и **IV**.

При переходе от метанольных растворов к водным, наблюдается гипсохромный сдвиг полосы испускания и дальнейшее гашение флуоресценции КБП. Слабая флуоресценция наблюдается лишь в случае соединений **IV** и **VII**, остальные производные КБП в воде не флуоресцируют.

В табл. 2 приведены флуоресцентные характеристики **IV** и **VII** в водном растворе в отсутствии и присутствии белка САЧ.

Как видно из таблицы, добавление САЧ приводит к падению интенсивности флуоресценции **VII** в 3 раза, сдвига полосы испускания при этом не наблюдается.

Таблица 2 – Флуоресценция соединений **IV** и **VII** в водных растворах.*

Соединение	Вода		Водный раствор, содержащий $3,5 \times 10^{-5}$ моль/л САЧ		$\gamma_{\text{ф}}$
	$\lambda_{\text{ф}}$, нм	$I_{\text{ф}}$, отн.ед.	$\lambda_{\text{ф}}$, нм	$I_{\text{ф}}$, отн.ед.	
IV	527	23	552	1209	52,56
VII	688	587	686	193	0,33

* $\lambda_{\text{ф}}$ – длина волны длинноволнового максимума испускания; $I_{\text{ф}}$ – интенсивность в максимуме полосы флуоресценции, $\gamma_{\text{ф}}$ – отношение интенсивностей флуоресценции растворов в присутствии и в отсутствии САЧ: $\gamma_{\text{ф}} = I_{\text{ф}}(\text{в растворе САЧ}) / I_{\text{ф}}(\text{в воде})$.

Изменения в спектрах **IV** в процессе титрования показаны на рис. 2. С ростом концентрации белка малоинтенсивная полоса в спектре флуоресценции **IV** смещается bathochromно на 25 нм, причем образование комплекса с белком сопровождается значительным усилением свечения. Величина $\gamma_{\text{ф}}$ для данного производного КБП превышает 50 ед. (табл. 2).

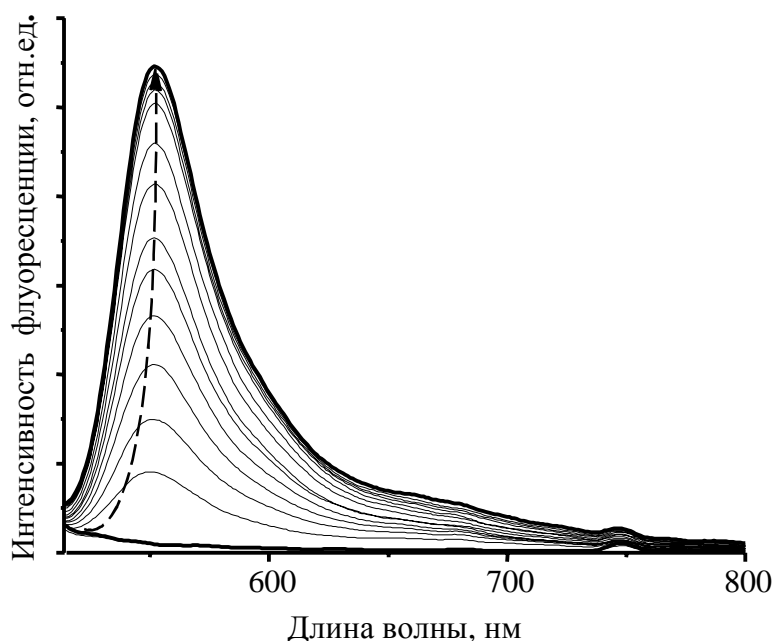


Рис. 2 – Изменение спектров флуоресценции КБП **IV** при увеличении концентрации САЧ в растворе.

Кривая титрования, приведенная на рис. 3, позволяет определить предел обнаружения белка в растворе. В интервале рабочих концентраций **IV** от 1×10^{-6} до 5×10^{-5} моль/л, достоверный прирост интенсивности свечения наблюдается при концентрации САЧ приблизительно 2×10^{-6} моль/л.

Если допустить, что одна молекула флуорофора связывается с одной молекулой белка, оценочное значение константы связывания будет составлять 5×10^5 ($\text{pK}_{\text{уст}} \approx 5,7$).

Выводы.

Исследования спектральных параметров КБП в органических средах и в воде, а также в водных растворах САЧ показали, что наиболее подходящим для последующих испытаний для использования в качестве флуоресцентного зонда является соединение **IV** – диметоксипроизводное КБП.

В присутствии белка данный флуорофор демонстрирует значительный батохромный сдвиг полосы испускания, а также возрастание интенсивности флуоресценции примерно в 50 раз.

Наблюдаемое изменение спектральных свойств **IV** позволяет использовать его для детекции низких, вплоть до 2×10^{-6} моль/л, концентраций протеинов в водных растворах.

Список литературы: 1. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с. 2. Кудряшова Е.В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии / Е.В. Кудряшова, А.К. Гладилин, А.В. Левашов // Успехи биологической химии. – 2002. – Т. 42. – С. 257 – 294. 3. Demchenko A.P. Introduction to Fluorescence Sensing / A.P. Demchenko. – N.-Y.: Springer, 2009. – 612 p. 4. Thompson R.B. Fluorescence Sensors and Biosensors / R.B. Thompson. – Boca Raton: Taylor and Francis, 2006. – 147 p. 5. Wagner B.D. The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems / B.D. Wagner // Molecules. – 2009. – № 14(1). – P. 210 – 237. 6. Øyvind M.A. Anthocyanins. in: Encyclopedia of Life Sciences / M.A. Øyvind. – N.-Y.: John Wiley & Sons Ltd. – 2001. – P. 1 – 8. 7. Вайсбергер А. Органические растворители / [А. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Дж. Риддик, Э. Тунс]. – М.: Изд. Иностранной литературы, 1958. – 520 с. 8. Дорошенко А.О. Spectra DataLab 2009 (программное обеспечение) / А.О. Дорошенко. – Х.: НИИ Химии при ХНУ им. В.Н. Каразина, 2009.

References: 1. Lakowicz J. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. Lakowicz. – Moscow: Mir, 1986. – 496 p. 2. Kudriashova E.V. Proteins in super-molecular ensembles: Structural investigations using time-resolved fluorescent anisotropy / E.V. Kudriashova A.K. Gladilin, A.V. Levashov // Successes in biological chemistry. – 2002. – Vol. 42. – P. 257 – 294. 3. Demchenko A.P. Introduction to Fluorescence Sensing / A.P. Demchenko; N.-Y.: Springer, 2009. – 612 p. 4. Thompson R.B. Fluorescence Sensors and Biosensors / R.B. Thompson – Boca Raton: Taylor and Francis, 2006. – 147 p. 5. Wagner B.D. The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems / B.D. Wagner // Molecules. – 2009. – № 14(1). – P. 210 – 237. 6. Øyvind M.A. Anthocyanins. in: Encyclopedia of Life Sciences / M.A. Øyvind. – N.-Y.: John Wiley & Sons Ltd., 2001. – P. 1 – 8. 7. Weissberger A. Органические растворители / [A. Weissberger, E. Proskauer, J. Riddick, E. Toops]. Moscow: Ed. Inostrannoi literatury, 1958. – 520 p. 8. Doroshenko A.O. Spectra DataLab. 2009 Software Package. / A.O. Doroshenko. – Kharkov: Research Institute of Chemistry at Kharkiv National University V.N. Karazin, 2009.

Поступила в редколлегию (Received by the editorial board) 24.05.14

Производные 2-(3-кумароил)бензопирилия как перспективные флуоресцентные зонды для детектирования протеинов в водных растворах / Э.В. САНИН, А.И. НОВИКОВ, А.Д. РОШАЛЬ // Вісник НТУ «ХПІ». – 2014. – № 28 (1071). – (Серія: Хімія, хімічна технологія та екологія). – С. 128 – 134. – Бібліогр.: 8 назв. – ISSN 2079-0821.

Досліджено спектральні властивості похідних солей 2-(3-кумароїл)бензопірилію (КБП) на предмет застосування даних сполук в якості флуоресцентних зондів для білків. Отримано спектральні характеристики КБП в дихлорметанових, метанольних та водних розчинах, а також у водних розчинах сироваткового альбуміну людини. Було показано, що з сьома досліджуваних сполук перспективним флуорофором є диметоксипохідне КБП. Ця сполука може бути використана для детектування присутності протеїнів у різних середовищах з нижчим лімітом приблизно 2×10^{-6} моль/л.

Ключові слова: катіони бензопірилію, кумарини, дихромофорні системи, перенос заряду при збудженні, флуоресцентні зонди

Derivatives of 2-(3-coumaroyl)benzopyrylium as perspective probes for the detection of proteins in aqueous solutions / E.V. SANIN, A.I. NOVIKOV, A.D. ROSHAL // Visnyk NTU «KhPI». – 2014. – № 28 (1071). – (Series: Khimiya, khimichna tekhnolohiya ta ecolohiya). – P. 128 – 134. – Bibliogr.: 8 names. – ISSN 2079-0821.

The spectral properties of 2-(3-coumaroyl)benzopyrylium salt derivatives (CBP) have been investigated to estimate the possibility of the use of these compounds as fluorescent probes for protein detection. The CBP spectral characteristics were obtained in dichlorometane, methanol, water solutions, as well as in aqueous solutions of human serum albumine. It was found that only one from seven compounds – CBP dimethoxy derivative is a perspective fluorophore. This compound can be used for protein detection in various media with lower limit 2×10^{-6} mol/l, approximately.

Keywords: benzopyrylium cationes, coumarines, dichromophores system, excited-state charge transfer, fluorescence probes.